

ESTUDIOS CONTROLADOS DE CAMPO SOBRE LA EFICACIA DE LAS VACUNAS FENOLIZADAS Y ALCOHOLIZADAS CONTRA LA FIEBRE TIFOIDEA*

Comisión Yugoslava sobre la Fiebre Tifoidea†

La vacunación contra la fiebre tifoidea se viene aplicando desde hace más de cincuenta años (1-3). Si bien se ha utilizado en medida considerable—en especial en el ejército (4, 5)—, no se obtuvieron hasta fecha reciente pruebas concluyentes del grado de protección que confiere.

Nuestro informe preliminar, publicado en 1957, sobre el primer estudio controlado de campo de las vacunas contra la fiebre tifoidea, reveló que la vacuna muerta por calor y conservada en fenol, confiere un considerable grado de protección, por lo menos después de un año de inmunización (6). El presente trabajo es el informe final sobre el estudio organizado en 1954 y 1955, y sobre las observaciones posteriores durante los seis años siguientes (1954-55 a 1960).

El primer estudio de Wright y sus colaboradores acerca de la vacuna contra la fiebre tifoidea dio resultados que, de un modo general, se aceptaron como prueba del valor protector de la vacuna muerta por calor, a pesar

de la crítica desfavorable de algunos autores de aquella época (7, 8). Cuando se volvieron a examinar las conclusiones del Comité Antitifoídico del Consejo Militar de Gran Bretaña (5), habida cuenta de lo aprendido en estudios de campo debidamente controlados, se comprobó que no eran del todo aceptables a la luz de las normas presentes. Estos estudios no reunían algunos requisitos esenciales; entre otros, el grupo vacunado y el testigo no podían compararse en muchos aspectos (9).

Desde que terminaron los estudios de campo del Comité Británico Antitifoídico, en 1912, se han ensayado otras vacunas en animales de laboratorio o bien midiendo la respuesta del hombre a la aglutinina. Los clásicos estudios de Felix sobre la estructura antigénica de la *Salmonella typhi* y la introducción por él de la vacuna alcoholizada, en la que se conservó el antígeno Vi (10), incrementaron el interés en la preparación de vacunas eficaces. La segunda guerra mundial brindó ocasiones de hacer observaciones en gran escala sobre el valor de la vacuna alcoholizada y de la fenolizada, más antigua. Los numerosos informes favorables y desfavorables aparecidos durante la guerra y después de ella, no han aclarado la situación (11-14).

Algunos autores soviéticos describieron varios estudios de campo llevados a cabo sobre todo con vacunas digeridas en tripsina, purificadas y adsorbidas que incorporan antígenos de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A y B*, *Shigella dysenteriae* y algunos otros (15-18). Dichos estudios no se llevaron a cabo de acuerdo con los principios de los estudios controlados de campo y, por consiguiente, fueron objeto de críticas (19).

Otro estudio, organizado por Mello *et al.* (20) con vacuna de administración oral,

* Estos estudios fueron subvencionados por las autoridades sanitarias de Yugoslavia, el Servicio de Salud Pública de la Secretaría de Salud, Educación y Bienestar de Estados Unidos y la Organización Mundial de la Salud. Este trabajo se publica en inglés en el *Bull. World Health Org.*, Vol. 26, No. 3, 1962.

† La Comisión estuvo integrada de la manera siguiente: Dr. B. Cvjetanović, Escuela de Salud Pública de la Universidad de Zagreb (dirección actual: División de Enfermedades Transmisibles, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza); Dr. H. Emili, Instituto Central de Higiene, Zagreb; Dr. D. Ikić, Institutos de Inmunología, Zagreb; Dr. A. Merdžo, Departamento de Enfermedades Infecciosas, Hospital General, Osijek; Dr. F. Mihaljević, Departamento de Enfermedades Infecciosas, Universidad de Zagreb; Dr. A. Nevidal, Instituto de Higiene, Osijek; Dr. J. Rucker, Institutos de Inmunología, Zagreb, y Dr. P. Tomasić, Instituto Central de Higiene, Zagreb.

abarcó un número muy reducido de personas, y también en este caso no se ajustó a las normas de los estudios de campo debidamente controlados.

En 1953, la Comisión Yugoslava sobre Fiebre Tifoidea, organizó el primer estudio controlado de campo sobre las vacunas anti-tifoidicas, conforme a los principios de los estudios en gran escala, tal como señala, por ejemplo, Cockburn (21).

El Dr. B. Cvjetanović se encargó de los estudios de campo; el Dr. Rücker se ocupó de la producción de las vacunas, y los Dres. J. Fališevac, A. Merdžo y F. Mihaljević hicieron la evaluación clínica de los casos. El Dr. P. Tomašić hizo los estudios serológicos, y el Dr. D. Ikić llevó a cabo las pruebas de laboratorio para determinar la actividad de las vacunas.

ESTUDIOS DE CAMPO DE VACUNAS CONTRA LA FIEBRE TIFOIDEA

Zona y población comprendida en el estudio

Un estudio de la fiebre tifoidea hecho en Yugoslavia reveló que la ciudad y el distrito de Osijek presentaban una incidencia persistentemente elevada (22). Había también un buen hospital general, con un gran departamento de enfermedades infecciosas, buenas instalaciones de laboratorio y un instituto de higiene bien organizado. La población de esa ciudad ascendía, en 1954, a 57.427 habitantes, y la de las aldeas vecinas, a 50.925, lo que sumaba un total de 108.352 habitantes. El número de casos de fiebre tifoidea notificados anualmente durante los 10 años anteriores al estudio de la ciudad de Osijek, ascendía a unos 150. La tasa de morbilidad en esa zona, entre 1946 y 1953, osciló entre 15,19 y 36,50 por 10.000 habitantes, y su promedio fue de 30,48 por 10.000.

Los registros del hospital de Osijek mostraban una distribución de casos de uno y otro sexo bastante similar. En los años de 1926 a 1936, la proporción más elevada de pacientes de fiebre tifoidea ingresados en el hospital correspondió al grupo de edad de 15-19 años. En los cinco años anteriores al estudio (1947-1951), el 70% de todos los

pacientes ingresados eran menores de 25 años.

La incidencia de fiebre tifoidea sólo acusaba un ligero aumento en el verano y el otoño.

La morbilidad por fiebre tifoidea era más elevada en la ciudad que en las aldeas vecinas, tal vez debido a las condiciones inadecuadas del sistema urbano de abastecimiento de agua y de eliminación de aguas servidas. En la ciudad y sus alrededores viven muchos portadores de gérmenes, y las aguas servidas contaminadas por *Salmonella typhi* descargan en el río Drava sin antes ser sometidas a tratamiento. La ciudad de Osijek se extiende en una angosta faja a lo largo de una de las orillas de dicho río. En aquella época, el agua del sistema de abastecimiento de la ciudad se tomaba directamente del río mediante dos estaciones de bombeo, una en la parte alta de la ciudad y otra en la parte baja. El agua sólo se sometía a cloración cuando entraba en las estaciones de bombeo. No se filtraba ni sedimentaba; por consiguiente, el agua contenía lodo en suspensión en cantidad variable. El agua de la parte baja de la ciudad se tomaba del río, aguas abajo del punto de desagüe de las alcantarillas de la parte alta de la ciudad. Normalmente, se encontraban *S. typhi* en el agua del río que entraba en la estación de bombeo antes de su cloración. Con frecuencia se podía aislar una o varias colonias de *S. typhi* en 1 ml. de agua del río. Debido a esta circunstancia, siempre se ha registrado una mayor prevalencia de fiebre tifoidea en la parte baja de la ciudad que en la parte alta. Eran frecuentes en la ciudad los casos de fiebre tifoidea transmitida por el agua, aunque también había de vez en cuando infecciones transmitidas por alimentos.

Las investigaciones serológicas hechas en 192 voluntarios (de 5 a 50 años de edad) seleccionados al azar, mostraron que habían estado muy expuestos a la infección, ya que en el 42% había anticuerpos H (títulos 1:25 a 1:500), 26,3% mostraron anticuerpos O (títulos 1:25 a 1:250) y el 12,5%, anticuerpos Vi (títulos 1:2 a 1:8). En aquel entonces, la

mayoría de los casos positivos revelaron a la vez dos o tres anticuerpos (22). El que hubiese anticuerpos en una parte considerable de los habitantes antes de la vacunación indicó que tal vez éstos gozaban de cierto grado de inmunidad básica a la fiebre tifoidea.

Plan del estudio

El objeto del estudio fue dar respuesta a las siguientes preguntas:

1) ¿Tienen algún valor en la prevención de la fiebre tifoidea las dos vacunas más utilizadas, es decir, la vacuna muerta y conservada en alcohol, y la vacuna muerta por calor conservada en fenol?

2) Y en caso afirmativo, ¿cuál de ellas es la más eficaz?

3) ¿Cómo se pueden comparar los resultados de las pruebas de potencia en el laboratorio con el grado de protección conferida a las personas inoculadas?

Sólo se inoculó a los voluntarios, o, si se trataba de niños, a aquellos cuyos padres dieron su consentimiento. Los vacunados objeto del estudio eran personas sanas de 5 a 50 años. Y durante la minuciosa observación ulterior de que estas personas fueron objeto, se descubrió que, entre los niños menores de 5 años, la prevalencia de la fiebre tifoidea era mucho mayor de lo que se creía antes debido a que los síntomas suelen ser en los niños muy moderados. Por esto, al año siguiente (1955), se aceptaron para su inmunización niños desde los dos años de edad. Se aceptaron voluntarios, siempre que no tuvieran antecedentes de fiebre tifoidea o de vacunación antitífoidica reciente, y que no padecieran ninguna enfermedad infecciosa u otro trastorno grave.

A fin de obtener una orientación para el estudio principal, se emprendió un estudio experimental entre 1.400 habitantes de una isla del Adriático, donde se utilizaron vacunas alcoholizada y fenolizada contra la paratifoidea B, junto con la vacuna de *Shigella flexneri* tipo II, preparada como vacuna testigo para el estudio principal. Aparte del empleo de vacuna contra la paratifoidea, en vez de vacunas antitífoidi-

cas, el estudio experimental se llevó a cabo exactamente de acuerdo con el plan del estudio principal. El procedimiento del estudio principal se modificó después, a tenor de los resultados del estudio experimental y, de esta manera, se evitó una serie de dificultades imprevistas.

Se procedió a la distribución al azar de los voluntarios en tres grupos: uno formado por los que recibieron la vacuna alcoholizada, otro compuesto por los que recibieron la vacuna fenolizada y un tercero a cuyos elementos se aplicó una vacuna fenolizada preparada con *Shigella flexneri* tipo II, como vacuna testigo. Se utilizó esta vacuna testigo con la esperanza de obtener alguna información sobre el posible valor de la vacunación contra la disentería.

El estudio se organizó de acuerdo con los principios de los estudios controlados de campo (19, 21). A los efectos de evitar cualquier parcialidad en la asignación de voluntarios a los grupos, las tres vacunas, que tenían un aspecto similar, llevaban sólo una indicación clave.

Asimismo, para evitar parcialidad de diagnóstico de fiebre tifoidea, sobre una base clínica o serológica, sólo se consideró como prueba definitiva de fiebre tifoidea el diagnóstico basado en hemocultivos positivos

Vacunas

Las vacunas se prepararon con una sola gran mezcla de cultivos de *S. typhi*, cepas Ty 2a y Ty 2b, con un fuerte contenido de antígenos O y Vi, facilitada por el Dr. A. Felix (hoy fallecido). La mitad del lote se trató con alcohol, de acuerdo con el método ideado por Felix (10), y la otra mitad fue inactivada por calor a la temperatura de 56°C., durante una hora, y luego se le agregó 0,5 % de fenol para conservarla. Cada vacuna antitífoidica contenía unos 3.000 millones de bacterias por ml., según se calculó mediante tubos de opacidad de Wellcome, para estandarización de vacunas bacterianas, escala revisada, 1952.

La vacuna testigo contra la disentería se preparó con dos cepas de *Sh. flexneri* tipo II,

recién aisladas, y contenía 1.500 millones de microorganismos por ml.

En la serie primaria de inyecciones de vacunación, puestas a un intervalo de tres semanas entre las dos dosis, se adoptó la siguiente escala de dosificación:

- Varones adultos: 0,25 ml. y 0,5 ml. (2.250 millones de bacterias).
- Mujeres adultas: 0,2 ml. y 0,4 ml. (1.800 millones de bacterias).
- Niños, 2-12 años: 0,2 ml. y 0,4 ml. de una dilución de vacuna de 1:4 (450 millones de bacterias).

Al cabo de un año se administró una dosis de refuerzo, equivalente a la primera dosis de la serie primaria.

Con objeto de evitar cualquier contaminación y para mayor seguridad, las vacunas fueron envasadas en ampollitas de una sola dosis.

Las vacunas utilizadas en las dosis de refuerzo y en la serie primaria en 1955, estaban recién preparadas, y de la misma manera que las vacunas empleadas en 1954.

Campaña de vacunación colectiva

La campaña de vacunación comenzó, después de una extensa labor de educación sanitaria popular, en marzo de 1954—mes en que la incidencia de fiebre tifoidea es, por lo general, escasa—y se completó en junio del mismo año. Participaron en la campaña 20 grupos de vacunación, cada uno de los cuales estuvo integrado por dos médicos y dos ayudantes. Antes de iniciar las actividades sobre el terreno, los integrantes de los grupos vacunadores recibieron un curso de instrucción de dos semanas sobre las prácticas y principios de los estudios controlados de campo, a los que debía ajustarse su labor. Las vacunas se almacenaron a la temperatura de 4°C. en el refrigerador y en pequeñas neveras durante el transporte y uso de las mismas por los equipos inoculadores.

Las vacunas se identificaban por letras cifradas, dos para cada vacuna, y la clave era desconocida por los vacunadores. Se distribuyeron entre éstos unas hojas donde

las letras cifradas aparecían al azar, y a cada sujeto voluntario se le asignó una letra de la lista, según el orden en que acudían a recibir la inyección.

Se llenó una ficha personal de cada voluntario, que más tarde se utilizó para la observación ulterior y el análisis.

Los voluntarios recibieron una inyección subcutánea en el brazo. La administración de las inyecciones tuvo lugar en fábricas, escuelas y otros locales, según las conveniencias de la población. A los que no acudieron a recibir la segunda inyección se les envió una tarjeta citándolos para otro día. Si el interesado no se presentaba se le enviaba otra tarjeta, y si este segundo aviso también fallaba, se visitaba a domicilio la persona en cuestión.

En la campaña de vacunación de 1955, que también empezó en marzo y terminó en junio, se administraron dosis de refuerzo. La finalidad de esta campaña consistía sobre todo en administrar dosis de refuerzo a las personas que habían recibido dos dosis de primoimmunización en 1954. Cada individuo recibió el mismo tipo de vacuna que el año anterior, según indicaba su ficha personal. Algunas personas no se presentaron a recibir la dosis de refuerzo.

En cambio, varias personas, particularmente niños (incluso los de 2 a 5 años de edad), acudieron a recibir la primera inmunización. Puesto que ya se sabía, por los resultados obtenidos el año anterior, que las vacunas contra la fiebre tifoidea eran eficaces, se acordó, por razones de ética, no administrar a estas personas la vacuna testigo de placebo. Algunos individuos a los que sólo se les había administrado una inyección el año anterior y que regresaron para revacunarse en 1955, recibieron entonces la serie completa de inyecciones de la misma vacuna intifóidica que recibieron en 1954.

De esta manera, al final de la primavera de 1955, ya había dos cohortes principales en el estudio controlado de campo (con tres grupos vacunados en cada cohorte), a saber:

A. Los que recibieron dos dosis primarias en 1954, sin ninguna dosis de refuerzo.

B. Los que sólo recibieron dos dosis primarias en 1954 y una dosis de refuerzo en 1955.

Había además una tercera cohorte:

C. Los que sólo recibieron dos dosis en 1955 y ninguna de refuerzo.

Esta tercera cohorte sólo contenía dos grupos vacunados, a los que se les administró, respectivamente, vacuna alcoholizada y vacuna fenolizada. Como en esta cohorte C no había un grupo testigo, no se considera como parte integrante del estudio controlado de campo, y se tratará de ella por separado de las cohortes A y B. El estudio de campo que abarcaba la cohorte C sólo tuvo por objeto evaluar la relativa eficacia de las vacunas alcoholizada y fenolizada, elaboradas y administradas en 1955.

Por tanto, los datos sobre las cohortes A y B se presentan como resultados del "estudio controlado de campo de 1954", y los relativos a la cohorte C, se ofrecen por separado como resultados del "estudio de campo de 1955".

Aunque hechos en el mismo lugar y en parte en el mismo período, deben ser considerados en realidad como pruebas aparte.

Las cohortes A y B son, en cierto grado, comparables con la cohorte C, pero difieren en ciertos aspectos, puesto que la cohorte C comprendía más habitantes urbanos y más niños, ya que abarcaba también a los menores de 5 años.

En 1954, sólo el 6,6% de los voluntarios no

completaron la serie (véase cuadro No. 3); en cambio, en 1955, los que no se presentaron a recibir la segunda inyección, ascendieron a un 14,3%, (véase cuadro No. 8).

Número de personas inoculadas

El cuadro No. 1 muestra el número de personas inoculadas durante el estudio de campo.

En 1954, el 33% de la población total de la ciudad y del distrito, o sea poco más o menos el 50% de las personas comprendidas en los grupos de edad de 5 a 50 años, recibieron la serie completa de inyecciones. Si se suma el número de personas vacunadas en 1954 y en 1955, se observará que el 44% de la población, o sea alrededor del 60% de los que podían recibir la vacuna, habían completado la serie de inyecciones de inmunización. En el distrito se vacunó a una cantidad de personas relativamente mayor que en la ciudad.

La distribución de los vacunados en tres grupos de vacuna, en 1954, resultó sencilla. Sin embargo, la campaña de 1955 comprendió las primoinmunizaciones y la dosis de refuerzo de los que ya habían sido vacunados en 1954, y, por consiguiente, los tres grupos originales se convirtieron en ocho grupos. En el cuadro No. 2 se presenta el número de personas que participaron en el estudio, en cada uno de los grupos de vacuna y en los sectores A, B y C.

CUADRO No. 1.—Número de personas que recibieron la serie completa de inyecciones de inmunización en el estudio de 1954 y 1955, según el lugar de residencia.

Lugar de residencia	No. total de habitantes		Número de personas incluidas en el estudio				No. de personas del estudio de campo de 1955		Total de personas del estudio de campo de 1954 y 1955 (A + B + C)
			1954		1955 y después		1955 y después		
	1954	1955	2 dosis en 1954 (A + B)	2 dosis en 1954 solamente (A)	2 dosis en 1954 y dosis de refuerzo en 1955 (B)	Total de personas del estudio controlado de campo de 1954 (A + B)		2 dosis en 1955 solamente (C)	
Ciudad de Osijek . . .	57.427	64.587	16.932	4.469	12.463	16.932	6.451	23.383	
Distrito de Osijek . .	50.925	60.413	18.576	4.529	14.047	18.576	4.837	23.413	
Ciudad y Distrito de Osijek	108.352	125.000	35.508	8.998	26.510	35.508	11.288	46.796	

CUADRO No. 2.—Número de personas que recibieron la serie completa de inyecciones de inmunización en el estudio de 1954 y 1955, según el tipo de estudio, el tipo de vacuna recibida, fecha de administración y dosificación.

Estudio	Año	Serie de inyecciones y cohortes	Vacunas			Total de personas del estudio
			Fenolizada	Alcoholizada	Testigo	
Estudio controlado de 1954	1954	(A + B) 2 dosis en 1954	11.503	12.017	11.988	35.508
	1955 y después	(A) 2 dosis en 1954 solamente	2.908	3.104	2.986	8.998
		(B) 2 dosis en 1954 y dosis de refuerzo en 1955	8.595	8.913	9.002	26.510
Estudio de 1955	1955 y después	(C) 2 dosis en 1955 solamente	5.688	5.600	—	11.288
Total de personas del estudio de 1955 y después.....			17.191	17.617	11.988	46796

RESULTADOS DEL ESTUDIO CONTROLADO DE CAMPO REALIZADO EN 1954

Similitud de los grupos vacunado y testigo

En este estudio controlado de campo se vacunaron en total 35.508 personas, las que se dividieron al azar en tres grupos y recibieron, respectivamente, vacuna fenolizada, vacuna alcoholizada y vacuna testigo. Como se observará en el cuadro No 3, estos grupos eran similares en edad, sexo, permanencia en la zona de estudio, profesión y antecedentes médicos.

Además, los grupos se compararon en relación con varias inoculaciones anteriores, y resultaron similares. Esta similitud de los grupos se observó también en unidades menores, es decir, calles, fábricas, escuelas, etc. (22). No obstante, se notaron ciertas discrepancias entre el número de personas asignadas a los tres grupos: el grupo de los que recibieron vacuna alcoholizada fue el más numeroso, y el grupo testigo, el menor. Estas diferencias son un poco mayores de lo que cabía esperar en una distribución al azar; su causa se desconoce.

Reacciones a la inoculación

En 1954 se estudiaron las reacciones a la inoculación correspondiente a la primera serie de inyecciones de inmunización. Se

registraron las reacciones locales y generales de 640 personas seleccionadas al azar (cuadro No. 4): estas personas fueron visitadas a las 24, 48 y 72 horas después de cada una de las dos inyecciones.

Como se indica en el cuadro No. 4 las reacciones no fueron graves. No se notaron grandes diferencias en las reacciones entre las vacunas, aunque la testigo puede haber tenido cierta ventaja. Por lo general, las reacciones a la segunda inyección fueron un poco mayores y más frecuentes que las observadas en la primera inyección. Cinco personas presentaron quistes en el sitio de vacunación, al parecer estériles, ya que no se encontraron bacterias en su contenido. No se registraron otras secuelas adversas.

En el cuadro No. 3 puede observarse que las personas que recibieron la vacuna testigo mostraron menos tendencia a evitar la segunda inyección, lo cual puede sugerir que las reacciones a la vacuna testigo fueron menos graves. Las otras dos vacunas parecen ser iguales a este respecto.

Observación ulterior

La responsabilidad de la búsqueda de casos en los grupos del estudio después de la vacunación, se hizo recaer sobre todo en los médicos generales y en los médicos de hospital de la zona, a los que se les encomendó que

CUADRO No. 3.—*Similitud de los grupos vacunados en los estudios controlados de campo en 1954 (Cohortes A y B).*

Grupos	Vacuna fenolizada	Vacuna alcoholizada	Vacuna testigo	Total
Total de vacunados.....	12.412	12.955	12.637	38.004
Completaron la vacunación..	11.503	12.017	11.988	35.508
No completaron la vacunación ..	909	938	649	2.496
Vivían en la parte alta de la ciudad .	4.457	4.665	4.568	13.690
Vivían en la parte baja	1.401	1.469	1.436	4.306
Vivían en el campo.....	6.554	6.821	6.633	20.008
Razón: varones—mujeres ..	6.204:6.208 (1.000:1.001)	6.451:6.504 (1.000:1.008)	6.274:6.363 (1.000:1.014)	18.929:19.075 (1.000:1.008)
Menores de 15 años.....	3.911	4.059	3.877	11.847
16-20 años.....	2.529	2.529	2.463	7.512
21-30 años	2.801	2.975	3.028	8.804
Mayores de 30 años.....	3.180	3.392	3.269	9.841
Niños de edad preescolar	606	608	557	1.771
Niños de edad escolar.	4.190	4.317	4.190	12.697
Con menos de 3 años de residencia .	1.318	1.307	1.383	4.008
Con más de 3 años de residencia....	11.094	11.648	11.254	33.996
Obreros.....	3.552	3.762	3.743	11.057
Empleados.....	946	1.018	1.017	2.981
Amas de casa.....	1.782	1.890	1.834	5.506
Con antecedentes de fiebre parati- foidea.....	14	14	17	45
Con antecedentes de difteria.....	251	276	297	824

CUADRO No. 4.—*Reacciones a la inoculación en 1954.*

Vacuna	Inoculación	Número de personas visitadas	Temperatura superior a 37°C.			Incapaces de trabajar			Dolores locales fuertes			Intensa cefalalgia			Rojez e hinchazón de un diámetro mayor de 10 cm.		
			el día			el día			el día			el día			el día		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Fenolizada...	1ª	214	17	6	2	14	3	2	11	3	0	12	3	0	7	5	3
	2ª	154	17	2	1	26	12	6	6	2	0	26	5	0	12	10	1
Alcoholizada	1ª	202	15	5	2	11	6	2	6	1	0	8	4	0	6	8	1
	2ª	147	15	4	1	25	12	7	8	1	0	25	7	0	13	10	1
Testigo	1ª	224	12	5	1	14	4	2	8	1	0	11	4	0	8	12	3
	2ª	175	9	3	1	17	7	3	5	1	0	15	2	0	8	4	1

enviaran todos los casos definidos o sospechosos de fiebre entérica al hospital para ser estudiados. Además, durante el primer año, dos enfermeras visitaban a domicilio todos los vacunados a intervalos de tres meses, para conocer los hábitos de saneamiento e higiene de la familia y asegurarse de que no faltaba ningún caso. En realidad, no se descubrió ningún otro caso sospechoso en el curso de esas visitas a domicilio.

En el cuadro No. 2 se indica el número de personas que recibieron la primera serie completa de inyecciones de inmunización, con la dosis de refuerzo o sin ella, y qué personas fueron objeto de observación ulterior.

Determinación clínica de los casos de fiebre tifoidea

Debido a la presencia de anticuerpos H, O y Vi en la población de las zonas endémicas de fiebre tifoidea, como es el caso de Osijek, puede registrarse un aumento de títulos de Widal en el curso de alguna otra enfermedad febril. En esas mismas zonas, hay muchos portadores de fiebre tifoidea que pueden presentar *S. typhi* en las heces durante otra enfermedad febril. A los efectos de evitar cualquier crítica en el sentido de que se

podieran incluir en las estadísticas casos dudosos de fiebre tifoidea, se impuso una norma muy estricta en el diagnóstico de fiebre tifoidea.

Sólo se consideraban casos demostrados de fiebre tifoidea los que resultaron positivos en los cultivos sanguíneos. Se definió como "caso probable" el que presentaba resultados negativos en los cultivos sanguíneos, pero resultados positivos en las heces, así como una enfermedad clínica típica. No pudo excluirse la posibilidad de que estos individuos fuesen portadores que, al mismo tiempo, sufrían de otra enfermedad, y, por consiguiente, la presentación de nuestros datos estadísticos no se basó en estos casos. Se puso especial empeño en demostrar cada caso mediante cultivos sanguíneos; en consecuencia, los casos probables no llegaron al 10% de los probados y estuvieron distribuidos proporcionalmente en los tres grupos de vacuna.

Incidencia de la fiebre tifoidea entre los vacunados

En los cuadros Nos. 5 y 6 se presenta la distribución de casos demostrados entre los distintos grupos de vacuna.

Un estudio del diagnóstico de las 151 per-

CUADRO No. 5.—Fiebre tifoidea entre personas vacunadas en el estudio controlado de campo de 1954.*
(Cohorte A: 2 dosis primarias en 1954)

Grupo de vacuna	1954-55		1955-60	1955-56	1956-57	1957-58	1958-59	1959-60	Total	
	No. observado	No. de casos	No. observado	No. de casos	No. de casos	No. de casos	No. de casos	No. de casos	No. de casos	Tasa media anual por 10.000
Fenolizada	11.503	7	2.908	0	0	1	0	0	8	1,6
Alcoholizada	12.017	17	3.104	0	0	0	1	0	18	2,9
Control	11.988	23	2.986	0	3	0	1	0	27	5,4

(Cohorte B: 2 dosis primarias en 1954 y dosis de refuerzo en 1955)

Grupo de vacuna	1955-60	1955-56	1956-57	1957-58	1958-59	1958-60	Total	
	No. observado	No. de casos	No. de casos	No. de casos	No. de casos	No. de casos	No. de casos	Tasa media anual por 10.000
Fenolizada	8.595	2	1	1	2	1	7	1,6
Alcoholizada	8.913	6	1	0	6	1	14	3,1
Control	9.002	8	4	6	9	1	28	6,2

* Los años empiezan el 1º de junio y terminan el 31 de mayo del año siguiente.

CUADRO No. 6.—*Incidencia de la fiebre tifoidea entre las personas vacunadas en el estudio controlado de campo de 1954.*

Grupo de vacuna	Plan de inmunización	Años después de la vacunación							Total	
		1		2		3	4	5	No. de casos	Tasa media anual por 10.000
		No. observado*	No. de casos	No. observado*	No. de casos	No. de casos	No. de casos	No. de casos		
Fenolizada	Serie primaria más dosis de refuerzo	8.595	2	8.595	1	1	2	1	7	1,6
	Serie primaria únicamente	11.503	7	2.908	0	0	1	0	8	1,9
	Total	20.098	9	11.503	1	1	3	1	15	1,9
Alcoholizada	Serie primaria más dosis de refuerzo	8.913	6	8.913	1	0	6	1	14	3,1
	Serie primaria únicamente	12.017	17	3.104	0	0	0	1	18	3,5
	Total	20.930	23	12.017	1	0	6	2	32	3,7
Testigo	Serie primaria más dosis de refuerzo	9.002	8	9.002	4	6	9	1	28	6,2
	Serie primaria únicamente	11.988	23	2.986	0	3	0	1	27	6,5
	Total	20.990	31	11.988	4	9	9	2	55	7,0

* El número de personas observadas no representa el verdadero número de vacunados con determinada vacuna en determinado año civil, sino el número de personas vacunadas que fueron observadas en el apropiado grupo de vacuna todos los años después de completar la vacunación. Así pues, los que recibieron la serie de inyecciones en 1954 y luego la dosis de refuerzo en 1955 aparecen dos veces: como grupo de vacunados en la primera serie correspondiente a sólo un año y, luego, como grupo que recibió una dosis de refuerzo en 1955 correspondiente a años sucesivos.

sonas vacunadas, hospitalizadas por cualquier motivo durante el período epidémico del 1° de junio al 30 de septiembre de 1954—en que ocurrieron la mayoría de casos de fiebre tifoidea—, reveló que la única marcada diferencia entre los tres grupos de vacuna consistía en la incidencia de fiebre tifoidea (cuadro No. 7).

Durante el pequeño brote de fiebre tifoidea ocurrido en 1958, el estudio de las personas vacunadas que ingresaron en el hospital por cualquier enfermedad reveló una vez más que los tres grupos de vacunados eran comparables en cuanto a la morbilidad de enfermedades distintas de la fiebre tifoidea. En el grupo que recibió la vacuna alcoholizada se registraron 7 casos demostrados de fiebre tifoidea, otros 7 en el grupo testigo y ninguno en el grupo de la vacuna fenolizada,

mientras que en cada grupo ocurrieron 3 casos probables.

Estos ejemplos representan una indicación más de la eficacia relativa de las vacunas y de la comparabilidad de los grupos vacunados y testigos en cuanto se refiere a la morbilidad de enfermedades infecciosas.

Esos fueron los dos únicos brotes de fiebre tifoidea registrados en Osijek durante el período de observación de 1954-1960. En esos años, la morbilidad de la fiebre tifoidea fue disminuyendo de manera constante. En 1955 se inició la construcción de un nuevo sistema de abastecimiento de agua que quedó terminado a principios de 1959. Esta obra ha contribuido mucho a controlar la fiebre tifoidea en Osijek y a la continua disminución de la morbilidad de esa enfermedad. Sin embargo, con la acertada instalación de este servicio se ha puesto casi fin a la realización

de otros estudios y observaciones ulteriores acerca de la eficacia de las vacunas contra la fiebre tifoidea.

Durante todo el período del estudio, como puede observarse en los cuadros 5 y 6, se descubrieron 102 casos, 15 en el grupo de la vacuna fenolizada, 32 en el grupo de la vacuna alcoholizada y 55 en el grupo testigo.

Las pruebas estadísticas confirman que hay una diferencia significativa entre el grupo de la vacuna fenolizada y el grupo testigo ($P < 0,001$). También es evidente la diferencia entre la protección conferida por la vacuna fenolizada en contraste con la vacuna alcoholizada, si bien sólo durante el primer año después de la vacunación ($P < 0,05$).

La distribución por edad de los casos ocurridos entre las personas vacunadas sugiere una diferencia algo más marcada entre el grupo de la vacuna fenolizada y los otros dos grupos, en cuanto a los niños jóvenes comparados con las personas mayores de 14 años.

Incidencia de la disentería y eficacia de la vacuna para combatirla

Puesto que se utilizó como testigo vacuna de *Sh. flexneri* tipo II, se dedicó atención a la incidencia de la disentería para saber si este tipo de vacuna confería protección contra la enfermedad.

Sólo se incluyeron en el análisis los casos de disentería bacteriana ingresados en el hospital en 1954 y 1955. Se registró un total de 39 casos, 33 de los cuales fueron debidos a *Sh. flexneri*. En 1954 y 1955, de los 39 casos, 11 se encontraban en el grupo que había recibido la vacuna de *Sh. flexneri* tipo II, 15 en el grupo de la vacuna antitífídica fenolizada y 13 en el grupo de la vacuna antitífídica alcoholizada. La diferencia entre el grupo de la vacuna contra la disentería y los dos grupos de la vacuna antitífídica no resultó significativa.

Incidencia de la fiebre paratifoidea

De los 16 casos de fiebre paratifoidea, 3, 7 y 6 ocurrieron, respectivamente, en el grupo de la vacuna fenolizada, en el de la

CUADRO No. 7.—*Diagnóstico en el hospital de los pacientes vacunados que ingresaron del 1º de junio al 30 de septiembre de 1954 en el hospital de Osijek.*

Diagnóstico en el hospital	Grupo de vacuna			Total
	Fenolizada	Alcoholizada	Testigo	
Fiebre tifoidea demostrada.	2	16	13	31
Fiebre tifoidea sospechada..	2	2	3	7
Disentería bacilar	13	16	10	39
Disentería amibiana	0	1	1	2
Gastroenterocolitis	2	4	4	10
Fiebre paratifoidea B.	2	1	2	5
Leptospirosis	9	9	13	31
Hepatitis infecciosa	5	0	4	9
Otros diagnósticos*	6	5	6	17
Todas las infecciones, excepto la fiebre tifoidea...	39	38	43	120
Todos los diagnósticos	41	54	56	151

* Entre éstos figuran la neumonía, pleuresía, escarlatina, faringitis, mononucleosis infecciosa y tuberculosis.

alcoholizada y en el testigo. Esas diferencias no tienen significación estadística. El número de casos es demasiado pequeño para poder sacar alguna conclusión, aunque podrían sugerir que la vacuna fenolizada pudiera haber dado cierta protección contra la fiebre paratifoidea.

RESULTADOS DEL ESTUDIO DE CAMPO HECHO EN 1955

En la primavera de 1955 se terminó la vacunación completa de un total de 11.288 voluntarios en este estudio, los cuales se dividieron al azar en dos grupos: uno que recibió la vacuna alcoholizada, y el otro, la vacuna fenolizada.

Similitud de los grupos vacunados

Como se muestra en el cuadro No. 8, había gran similitud entre el grupo de la vacuna alcoholizada y el de la vacuna fenolizada, en cuanto a la edad de las personas, y al sexo, ocupación, lugar de residencia y antecedentes médicos.

Asimismo, no había mucha diferencia entre

CUADRO No. 8.—*Similitud de los grupos de vacunados en los estudios de campo de 1955.*

(Cohorte C)

Grupos	Vacuna fenolizada	Vacuna alcoholizada	Total
Total de vacunados	6.629	6.580	13.209
Completaron la vacunación	5.688	5.600	11.288
No completaron la vacunación	941	980	1.921
Vivían en la parte alta de la ciudad	2.765	2.737	5.502
Vivían en la parte baja	902	857	1.759
Vivían en el campo	2.962	2.986	5.948
Razón: Varones—mujeres	3.163:3.466 (1.000:1.096)	3.101:3.479 (1.000:1.122)	6.264:6.945 (1.000:1.109)
Menores de 5 años	1.120	1.107	2.227
6-15 años	1.762	1.771	3.533
16-20 años	827	845	1.672
21-30 años	1.610	1.531	3.141
Mayores de 30 años	1.310	1.326	2.636
Niños de edad preescolar	1.737	1.740	3.477
Niños de edad escolar	1.230	1.204	2.434
Con menos de 3 años de residencia	1.416	1.374	2.790
Con más de 3 años de residencia	5.213	5.206	10.419
Obreros	1.724	1.713	3.437
Empleados	491	469	960
Amas de casa	1.037	1.045	2.082
Con antecedentes de paratifoidea	9	12	21
Con antecedentes de difteria	111	123	234

CUADRO No. 9.—*Casos de fiebre tifoidea entre las personas vacunadas en el estudio de campo de 1955.**

(Cohorte C: 2 dosis primarias en 1955)

Grupo de vacuna	1955-60	1955-56	1956-57	1957-58	1958-59	1959-60	Total	
	No. de observados	No. de casos	No. de casos	No. de casos	No. de casos	No. de casos	No. de casos	Tasa media anual por 10.000
Fenol	5.688	0	0	1	0	0	1	0,4
Alcohol	5.600	0	3	2	11	0	16	5,7

* Los años empiezan el 1º de junio del primer año (1955) y terminan el 31 de mayo del año siguiente.

las personas que integraban la población vacunada en el estudio de campo de 1955 y las de la población comprendida en el estudio controlado de campo hecho en 1954 (véase cuadro No. 3). Sin embargo, como ya se ha indicado, el estudio de 1955 contenía más preescolares que el de 1954; además, en el

estudio de 1955 había niños menores de 5 años, los que se excluyeron del de 1954.

Determinación clínica y observación ulterior de los casos de fiebre tifoidea

Estas actividades se realizaron exactamente igual a las correspondientes del estudio

controlado de campo hecho en 1954, y las reacciones observadas fueron también semejantes a las del año citado.

Incidencia de la fiebre tifoidea entre los vacunados

El cuadro No. 9 muestra la incidencia de la fiebre tifoidea entre los vacunados. Durante el período de 5 años de observación hubo relativamente pocos casos, excepto en 1958 en que ocurrió una epidemia. La incidencia observada en los dos grupos vacunados mostró que la vacuna fenolizada preparada en 1955 fue superior a la vacuna alcoholizada (como ocurrió en 1954); las pruebas estadísticas confirman la diferencia significativa observada entre los dos tipos de vacunas ($P < 0,001$). Además, la vacuna fenolizada produjo una inmunidad más duradera, como se comprobó por su eficacia hasta tres años después de la inmunización, en comparación con una incidencia apreciablemente más alta observada estadísticamente en el grupo de la vacuna alcoholizada en el período 1958-59.

Pasando por alto la cuestión de la superioridad de un tipo de vacuna respecto del otro, quedó demostrado, sin embargo, que, según los resultados obtenidos, la vacuna fenolizada es eficaz en la prevención de la fiebre tifoidea, aun a pesar de que no hubo grupo testigo en la cohorte C. Esto refuerza una vez más los resultados del estudio controlado de campo de 1954.

La distribución de los casos por edades entre los vacunados no indicó diferencia alguna de la protección conferida por grupo de edades.

COMPARACION DE LAS PRUEBAS DE CAMPO CON LAS DE LABORATORIO

Respuesta serológica a la inmunización

En 1954 y 1955 se llevaron a cabo, en Osijek, investigaciones serológicas anuales en 200 personas. Se formaron tres grupos similares, según la vacuna recibida, y se obtuvieron muestras de sangre de esos grupos antes de cada inoculación, y a los seis meses después de completada la serie de inyecciones de inmunización.

Se efectuaron las pruebas de aglutinación H y O, así como las pruebas opsonocitofágicas y las relativas a los anticuerpos Vi. Los títulos de anticuerpos Vi en personas a quienes se administró la vacuna alcoholizada resultaron substancialmente más elevados. Los títulos de H y O fueron un poco mayores que los correspondientes al grupo de la vacuna fenolizada. La vacuna contra la disentería estimuló la producción de anticuerpos contra la fiebre tifoidea, pero en menor grado. Los resultados no fueron concluyentes, en especial debido a los títulos de anticuerpos residuales encontrados en la población de esta zona endémica. Por consiguiente, la vacunación, tal como se había planeado en un principio se repitió en voluntarios del ejército en 1956; los resultados correspondientes se presentan en el cuadro No. 10. En cada grupo había 200 voluntarios que no tenían anticuerpos antes de entonces.

Los resultados indican diferencias entre las respuestas serológicas a las vacunas, en el sentido de que la vacuna alcoholizada estimuló la producción de un título significativamente mayor de anticuerpos Vi. Este hallazgo no puede relacionarse en forma

CUADRO No. 10.—*Respuesta serológica a las vacunas en 600 voluntarios del ejército.*

Vacuna	Título O		Título H		Título Vi		Índice opsonocitofágico (media aritmética)
	Media geométrica	Porcentaje de positivos	Media geométrica	Porcentaje de positivos	Media geométrica	Porcentaje de positivos	
Fenolizada	60,4	81,3	567,5	100,0	2,3	55,1	1,73
Alcoholizada	50,3	87,3	500,3	95,9	4,6	67,3	3,05
Control	44,9	64,0	71,6	68,0	1,8	24,0	1,59

alguna con los resultados del estudio de campo.

Pruebas de laboratorio sobre la potencia de las vacunas

Se hicieron pruebas de protección pasiva del ratón, pruebas de protección activa del ratón (sin mucina) y pruebas de la formación de anticuerpos Vi, O y H. Ambas vacunas dieron resultados comparables con otras vacunas del mismo tipo, y, por consiguiente, pueden en medida razonable ser consideradas como representativas de su tipo.

La vacuna alcoholizada resultó superior en cuanto a producción de anticuerpos ai, si bien inferior en cuanto a estimular anticuerpos O y H. Las pruebas de protección pasiva del ratón con suero de conejo favorecieron la vacuna alcoholizada, mientras que las de protección activa del ratón se inclinaron por la vacuna fenolizada. Según los métodos utilizados, no se pudo mostrar que una de esas dos vacunas diera mejores resultados que la otra, ya que, con diferentes métodos de laboratorio, se obtuvieron resultados distintos. En otros ensayos, sólo se utilizó la prueba de protección activa del ratón, mejor planeada y aplicando estrictamente la selección al azar de ratones, dosis y vacunas. El estudio comprende 49 ensayos. Los resultados de las pruebas figuran en el cuadro No. 11, así como los resultados del análisis estadístico.

Como puede observarse en el mencionado

CUADRO NO. 11.—*Resultado de las pruebas de protección activa del ratón.*

Dosis de vacuna (No. de bacterias)	Ratones muertos al 4º día			
	Fenolizada		Alcoholizada	
	muer-tos/ total	%	muer-tos/ total	%
250.000.000	123/461	26,6	196/461	42,5
50.000.000	206/460	44,7	289/464	62,2
10.000.000	318/455	69,8	359/462	77,7

Diferencias entre las muestras: $P < 0,001$

Regresión lineal: $P < 0,001$

Desviación del paralelismo: $0,4 < P < 0,5$

cuadro No. 11, en esta serie de ensayos la vacuna fenolizada fue en grado significativo mejor que la vacuna alcoholizada, y los propios datos no contradicen el supuesto de que son paralelas a las líneas de regresión de la dosis-respuesta.

De lo que antecede, parece inferirse que las pruebas de protección activa del ratón, en la forma en que se efectuaron en nuestros laboratorios, corresponden más estrechamente que otras pruebas a los resultados obtenidos en el campo. No obstante, el problema de probar en el laboratorio las vacunas contra la fiebre tifoidea requiere nuevos estudios.

CONCLUSIONES

Si bien el estudio de campo hecho en Osijek con dos tipos de vacuna (alcoholizada y fenolizada) contra la fiebre tifoidea, teniendo en cuenta los requisitos de un estudio controlado de campo, ha demostrado la eficacia de la vacuna fenolizada, los resultados no significan que se podría obtener el mismo grado de protección con otro lote del mismo tipo de vacuna fenolizada o alcoholizada, en otras circunstancias. El valor de la vacuna fenolizada quedó demostrado en las circunstancias dadas, indicando que era eficaz en una zona endémica, entre la población de Osijek, que posee algunos anticuerpos básicos, y que confería protección a tres cuartas partes, aproximadamente, de la población vacunada. Conviene señalar también que no hay razón para creer que se obtendrían los mismos resultados en cualquier otro lugar. Es posible que el plan de dos inyecciones, administradas a un intervalo de tres semanas, más una dosis de refuerzo al cabo de un año, no ofrezca los mejores resultados posibles; tal vez haya otros planes mejores. En la práctica, es preferible emplear vacuna fenolizada, no sólo por su mayor eficacia, sino también porque puede aplicarse en el campo sin refrigeración. No obstante, es evidente que se necesitan muchos más trabajos, incluso estudios de laboratorio y ensayos sobre el terreno, para determinar cuál

es la fracción protectora realmente importante de la vacuna contra la fiebre tifoidea. Los resultados obtenidos en Osijek sugieren que el anticuerpo Vi tal vez no sea tan importante en el hombre como en el ratón. No sabemos todavía cuáles son las preparaciones antigénicas más efectivas, ni cuál el método óptimo de su aplicación, ya que el valor protector de la vacuna contra la fiebre tifoidea no puede medirse eficazmente con las actuales pruebas de laboratorio.

Los resultados de este estudio y de las pruebas de laboratorio relacionadas con él ponen de relieve la complejidad del problema y la necesidad de más trabajos e investigaciones en este campo.

RESUMEN

A fin de determinar la eficacia de las vacunas contra la fiebre tifoidea humana, se organizaron estudios controlados de campo—los primeros de esta naturaleza—en la ciudad de Osijek y en su distrito, Yugoslavia, en 1954-1960. Se utilizaron monovacunas; muertas por el calor y conservadas en fenol, y muertas por alcohol y conservadas en alcohol también. Como control se empleó vacuna fenolizada contra la disentería. Se distribuyeron al azar unos 36.000 voluntarios en tres grupos comparables: uno que recibió la vacuna fenolizada, otro que recibió la vacuna alcoholizada, y el grupo testigo. La inmunización consistió en una serie primaria de dos inyecciones, y un año después se administró una dosis de refuerzo. La eficacia de las vacunas se midió comparando la morbilidad específica de los tres grupos y, para mayor exactitud, sólo se tuvieron en consideración

en el análisis estadístico los casos de tifoidea bacteriológicamente demostrados. Además, en 1955 se vacunaron unas 11.000 personas, que se separaron al azar en dos grupos que recibieron, respectivamente, vacuna fenolizada y vacuna alcoholizada; no hubo grupo testigo en este caso. Se observó que la vacuna fenolizada confiere una protección relativamente importante, mientras que la eficacia de la vacuna alcoholizada es escasa o nula. La eficacia de la vacuna fenolizada fue bastante duradera y más pronunciada en los grupos de edad jóvenes. Los resultados obtenidos en el hombre en estos estudios sobre el terreno no están de acuerdo con los de las pruebas de laboratorio hoy conocidas. Ni los ensayos de laboratorio en ratones, ni las pruebas serológicas en el hombre podrían correlacionarse con los resultados de los estudios de campo. Por esta razón, hay que hacer nuevos estudios para determinar el valor de otros varios tipos de vacuna contra la fiebre tifoidea y para conseguir pruebas fidedignas de laboratorio que permitan medir la actividad de aquélla.

AGRADECIMIENTOS

La Comisión expresa su profundo reconocimiento a la población de Osijek que, con su apoyo, permitió llevar a cabo estas investigaciones; a las autoridades sanitarias de Yugoslavia, al Servicio de Salud Pública de la Secretaría de Salud, Educación y Bienestar de Estados Unidos y a la Organización Mundial de la Salud por la ayuda financiera prestada; y al laboratorio y personal de campo de Yugoslavia y del extranjero que, con sus consejos, estímulo y cooperación proporcionaron ayuda de inestimable valor.

REFERENCIAS

- (1) Pfeiffer, R., y Kolle, W.: *Dtsch. Med. Wschr.*, 22:735, 1896.
- (2) Wright, A., y Semple, D.: *Brit. Med. Jour.*, 1:256, 1897.
- (3) Wright, A.: *Lancet*, 1:150, 1900.
- (4) Vysokovich, V. K.: *Trud. Obshch. Kiev. Vrach.*, 5:124, 207, 1900.
- (5) Gran Bretaña, Consejo Militar, Comité Antitífidoico: *Report . . . Londres*, 1913.
- (6) Comisión Yugoslava sobre la Fiebre Tifoidea: *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 16:897, 1957.
- (7) Pearson, K.: *Brit. Med. Jour.*, 2:1243, 1904.
- (8) Bruce, D.: *Jour. Roy. Army Med. Cps*, 4:244, 1905.
- (9) Cockburn, W. C.: *Jour. Roy. Army Med. Cps*, 101:171, 1955.
- (10) Felix, A.: *Brit. Med. Jour.*, 1:391, 1941.

- (11) Siler, J. F., *et al.*: *Immunization to typhoid fever*, Baltimore, 1941.
- (12) Boyd, I. S. K.: *Brit. Med. Jour.*, 1: 719, 1943.
- (13) Jordan, J., y Jones, H.: *Lancet*, 2:333, 1945.
- (14) Holt, R. L.: *Am. Jour. Pub. Health*, 38:481, 1948.
- (15) Slavin, G. P.: En: *Proceedings of the Metchnikov Institute of Vaccines and Sera*, Moscú, 7:686, 1956.
- (16) Yablokov, V. A.: En: *Proceedings of the Metchnikov Institute of Vaccines and Sera*, Moscú, 7:695, 1956.
- (17) Kheifets, L. B. *et al.*: *Z. Mikrobiol.* (Mosk), No. 10, 1958, pág. 49.
- (18) Savina, N. A.: *Z. Mikrobiol.* (Mosk), No. 7, 1959, pág. 7.
- (19) Cvjetanović, B.: *Jour. Hyg. Epidem. Microbiol. & Immunol.*, (Praga), 5:7, 1961.
- (20) Mello, F. *et al.*: *Arch. Esc. Med.-Cirug.*, Nova Goa, 6:767, 1931.
- (21) Cockburn, W. C.: *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 13:395, 1955.
- (22) Komisja za Tifus: *Vrijednost cijepiva protiv trbsnog tifus*, Zagreb, 1957.